

Transgenic plant, especially potato, resistant to Phythophthora infestans, contains gene for hydroxycinnamic acid-coenzymeA: tyramine N-hydroxycinnamic acid transferase

Publication number: DE19846001

Publication date: 2000-04-27

Inventor: SCHEEL DIERK (DE); ROSAHL SABINE (DE); STRACK DIETER (DE); SCHMIDT AXEL (DE)

Applicant: BIOPLANT BIOTECHNOLOGISCHES FO (DE); INST PFLANZENBIOCHEMIE IPB (DE)

Classification:

- international: **C12N9/10; C12N15/82; C12N9/10; C12N15/82;** (IPC1-7): A01H5/00

- European: C12N9/10C1; C12N15/82C4B; C12N15/82C8B6B

Application number: DE19981046001 19981006

Priority number(s): DE19981046001 19981006

Report a data error here

Abstract of DE19846001

Transgenic plant with increased resistance to infection by phytopathogens, especially Phythophthora infestans, contains, in its genome, a gene construct comprising a heterologous promoter, and a sequence (I) encoding a hydroxycinnamic acid-coenzyme A:tyramine N-(hydroxycinnamic acid) transferase (II), under the control of the promoter. Independent claims are also included for the following: (1) a tissue culture containing parts or organs of the novel plant; (2) sprouted tubers of the novel plant; (3) a nucleic acid (Ia) encoding a specific (II); (4) a construct containing (Ia) under the control of expression regulating elements; and (5) a method for preparing the novel plant.

.....
Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 46 001 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁷:
A 01 H 5/00

②1 Aktenzeichen: 198 46 001.5
②2 Anmeldetag: 6. 10. 1998
④3 Offenlegungstag: 27. 4. 2000

DE 198 46 001 A 1

⑦1 Anmelder:
Bioplant Biotechnologisches Forschungslabor
GmbH, 29574 Ebstorf, DE; Institut für
Pflanzenbiochemie (IPB), 06120 Halle, DE

⑦4 Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser,
80538 München

⑦2 Erfinder:
Scheel, Dierk, Prof. Dr., 06110 Halle, DE; Rosahl,
Sabine, Dr., 06114 Halle, DE; Strack, Dieter, Prof. Dr.,
38300 Wolfenbüttel, DE; Schmidt, Axel, 06114
Halle, DE

⑤6 Entgegenhaltungen:
NICHTS ERMITTELT

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Transgene Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegen den Befall durch Phytopathogene

⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft transgene Pflanzen, die erhöhte Resistenz gegen den Befall durch Phytopathogene, und insbesondere gegen den Befall durch den Oomyceten *Phytophthora infestans* aufweisen, sowie ein Verfahren und eine Nukleinsäure zur Herstellung der transgenen Pflanzen und verschiedene Verwendungen der Nukleinsäure. Die transgenen Pflanzen enthalten in deren Genom ein chimäres Genkonstrukt, umfassend: a) einen heterologen Promotor, und b) eine Sequenz (1), die ein für ein Protein mit Hydroxymethylsäure-CoA:Tyramin-N-(Hydroxymethylsäure)-Transferase (THT)-Aktivität codierende Sequenz enthält und unter der transkriptionellen Kontrolle des heterologen Promotors steht.

DE 198 46 001 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft transgene Pflanzen, die erhöhte Resistenz gegen den Befall durch Phytopathogene, insbesondere gegen den Befall durch den Oomyceten *Phytophthora infestans* aufweisen, sowie ein Verfahren und eine Nukleinsäure zur Herstellung der transgenen Pflanzen und verschiedene Verwendungen der Nukleinsäure.

Zahlreiche Erkrankungen, die Pflanzen von großer wirtschaftlicher Bedeutung befallen, werden durch phytopathogene Organismen, wie Viren und Viroide, Bakterien und Pilze, verursacht. Phytopathogene verursachen große Ernteverluste bei wirtschaftlich bedeutenden Kulturarten, wie z. B. abgeschätzt für Reis (11–30% weltweit durch *Magnaporthe grisea*, 10–27% in Indien durch *Rhizoctonia solani*, Gerste (ca. 9% durch *Erysiphe graminis* in Großbritannien und Irland) und Mais (ca. 1 Mrd. US-Dollar durch *Cochliobolus heterostrophus* in den USA). Für die Kartoffel wurde z. B. 1986 für die USA ein Ernteverlust von ca. 370 Mio. US-Dollar durch *Phytophthora infestans* geschätzt. Weltweit würde es ohne den Einsatz von Fungiziden vermutlich zu Verlusten im Bereich von 30–40% kommen (Oerke et al., 1994).

Ein Beispiel für durch Phytopathogene verursachte Pflanzenkrankheiten ist die Kraut- und Knollenfäule, die wichtigste Kartoffelkrankheit in niederschlagsreichen Gebieten der gemäßigten Zonen. Erreger ist der Oomycet *Phytophthora infestans*, der in der Natur fast ausschließlich als obligater Parasit mit engem Wirtspflanzenkreis lebt. Die wirtschaftlich wichtigsten Wirtspflanzen sind die Kartoffel- und Tomatenpflanzen, aber auch andere Pflanzen der Familie der Nachtschattengewächse können befallen werden.

Bei Tomatenpflanzen kann die gesamte Pflanze (mit Ausnahme der Wurzel) von dem Oomyceten befallen werden. Auf den Früchten bilden sich dann graugrüne, später eher braune runzelige Flecken aus; die Frucht bleibt außen hart, im Inneren wird sie jedoch faul und dadurch ungenießbar. Bei den Kartoffelpflanzen macht sich der Befall mit *Phytophthora infestans* durch die Ausbildung von Flecken und Verbräunungen am Blatt und Stengel bemerkbar, die bis zum völligen Absterben der Pflanzen führen können. Insbesondere bei frühem und starkem Befall wird die Ertragsleistung des befallenen Bestandes wesentlich gemindert, weil die Zerstörung des Krautes Assimilationsverlust und dadurch vermindertes Knollenwachstum bedeutet. Hat der Oomycet in feuchten Sommern optimale Bedingungen zur Vermehrung, können die Ertragsausfälle 20% des durchschnittlichen Kartoffelertrags übersteigen. Bedingt durch vollmechanisierte Ernte und Einlagerung haben in den letzten Jahren die Probleme mit sekundären Weichfäulen nach *Phytophthora*-Befall zugenommen. Braunfäulesymptome an den Knollen treten bei frühen Knolleninfektionen bereits auf dem Feld bzw. bei der Ernte auf und verstärken sich in der anschließenden Lagerperiode, so daß am Lager erhebliche Verluste entstehen können.

Der vorliegenden Erfindung lag das technische Problem zugrunde, transgene Pflanzen bereitzustellen, die eine erhöhte Resistenz gegen den Befall durch Phytopathogene, insbesondere gegen den Befall durch den Oomyceten *Phytophthora infestans* aufweisen.

Dieses Problem wird erfindungsgemäß durch eine transgene Pflanze gelöst, deren Genom ein chimäres Genkonstrukt enthält, umfassend:

- a) einen heterologen Promotor, und
- b) eine Sequenz (1), die eine für ein Protein mit Hydroxyzimtsäure-CoA : Tyramin-N-(Hydroxyzimtsäure)-Transferase (THT)-Aktivität codierende Se-

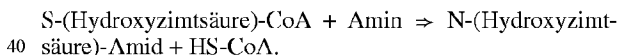
quenz enthält und unter der transkriptionellen Kontrolle des heterologen Promotors steht.

"Erhöhte Resistenz", wie hier verwendet, bedeutet die Fähigkeit einer erfindungsgemäßen Pflanze, beim Befall durch ein Phytopathogen eine geringere Beeinträchtigung ihrer Leistungsfähigkeit zu zeigen als die Wildtyppflanze, oder gar ihre volle Leistungsfähigkeit beizubehalten. Die Anfälligkeit von Sorten für Krankheitserreger wird in der "Beschreibenden Sortenliste" des deutschen Bundessortenamtes durch die Boniturstufen 1 (Anfälligkeit für Krankheiten sehr gering) bis 9 (Anfälligkeit für Krankheiten sehr stark) wiedergegeben. Die relative Anfälligkeit neuer Pflanzen wird im Verhältnis zu Sorten mit definierten Anfälligkeiten bestimmt. Ein Maß der Anfälligkeit für *Phytophthora infestans* sind die Befallshäufigkeit und der Sporulationsindex, die beide mit Hilfe des Hodgson-Tests (Hodgson, 1961) ermittelt werden: Die Einführung des chimären Genkonstruktes führt zu einer Heraufstufung (geringere Anfälligkeit) in dem Boniturschema im Vergleich zu eingestufen Sorten um zumindest eine Stufe.

"Chimäres Genkonstrukt", wie hier verwendet, bezeichnet eine rekombinante Nukleinsäure, die Sequenzen aus mehr als einem Organismus enthält.

"Heterologer Promotor", wie hier verwendet, bezeichnet einen Promotor, der von einem anderen Gen stammt als die unter seiner Kontrolle stehende codierende Sequenz. Beispiele für einen solchen Promotor sind der Mannopin- oder der Nopalinsynthasepromotor von *Agrobacterium tumefaciens* oder die Promotoren der Stpk1- und ChtA2-Gene von *Solanum tuberosum*.

Unter "Protein mit Hydroxyzimtsäure-CoA : Tyramin-N-(Hydroxyzimtsäure)-Transferase (THT)-Aktivität" im Sinne der Erfindung wird ein Protein verstanden, das den Transfer von Hydroxyzimtsäuren verschiedener CoA-Ester auf Tyramin oder andere Amine unter Bildung von Hydroxyzimtsäureamid katalysiert:



Werden beispielsweise Kartoffelpflanzen von *Phytophthora infestans* befallen, so sind die primären Ziele des Oomyceten die Blätter und nicht die Knollen. Bei Wildtyppflanzen hat man in den Blättern eine starke Stimulierung verschiedener Enzyme des Phenylpropanoid-Stoffwechsels und unter anderem der Hydroxyzimtsäure-CoA : Tyramin-N-(Hydroxyzimtsäure)-Transferase (THT) beobachtet, die von einer Zunahme der Reaktionsprodukte (Tyraminamide) gefolgt wird. In Zellkulturen werden die Reaktionsprodukte sowohl in die Zellwand eingebaut als auch ins Kulturmedium ausgeschieden. Die Zellwand erlangt nach dem Einbau der Produkte einen höheren Widerstand gegen Angriffe und dient dadurch als chemische Barriere gegen Phytopathogene wie *Phytophthora infestans*. Außerdem scheinen die ins Kulturmedium ausgeschiedenen Tyraminamide eine Rolle bei der Hemmung des Wachstums potentieller Phytopathogene zu spielen.

Es hat sich herausgestellt, daß transgene Pflanzen, denen eine für das THT-Protein codierende Sequenz unter der Kontrolle eines heterologen, in Pflanzen funktionellen Promotors eingebaut wurde, eine erhöhte Resistenz gegen den Befall durch Phytopathogene und insbesondere durch *Phytophthora infestans* aufweisen. Ohne an eine Theorie gebunden zu sein, scheint die erhöhte Resistenz der Pflanzen auf den Zellwandeinbau von Tyraminamiden, die als Produkt der vom THT-Protein katalysierten Reaktion in höherer Konzentration vorhanden sind, zurückzuführen zu sein.

Transgene Pflanzen gemäß der vorliegenden Erfindung können beispielsweise den Pflanzenfamilien Malvaceae (z. B. Baumwolle), Brassicaceae (z. B. Raps), Cucurbitaceae (z. B. Melone), Chenopodiaceae (z. B. Zuckerrübe) oder Gramineae (z. B. Mais) angehören oder von diesen abgeleitet sein. Vorzugsweise gehört die erfindungsgemäße transgene Pflanze der Familie Solanaceae an oder ist von dieser abgeleitet. Besonders bevorzugt gehört die transgene Pflanze gemäß der Erfindung der Art *Solanum tuberosum* (Kartoffelpflanze) an oder ist von dieser abgeleitet, sie kann aber auch der Art *Lycopersicon esculentum* (Tomatpflanze) angehören oder von dieser abgeleitet sein.

Vorzugsweise stammt die Sequenz (1), die eine für ein Protein mit Hydroxyzimtsäure-CoA : Tyramin-N-(Hydroxyzimtsäure)-Transferase (THT)-Aktivität codierende Sequenz enthält, von *Solanum tuberosum*. Die Sequenz (1) kann ausgewählt werden aus:

a) einer Sequenz, die für ein Protein codiert, das mindestens eine der folgenden Aminosäuresequenzen enthält:

- i) Leu His Gly Glu Asn Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 3)
- ii) Leu His Gly Glu Thr Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 4)
- iii) Leu His Gly Arg Asn Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 5)
- iv) Leu His Gly Arg Thr Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 6)
- v) Ile Thr Thr Asn Glu Gly (SEQ-ID Nr. 7)
- vi) Phe Pro Val Val Glu Gly Gln Val Glu Glu Phe Arg Ser Lys (SEQ-ID Nr. 8)
- vii) Phe Pro Val Val Glu Gly Glu Val Glu Glu Phe Arg Ser (SEQ-ID Nr. 9)
- viii) Pro Val Leu Thr Thr Phe (SEQ-ID Nr. 10)
- ix) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 11)
- x) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 12)
- xi) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 13)
- xii) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 14)
- xiii) Ala Thr Glu Ser His Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 15)
- xiv) Ala Thr Glu Ser His Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 16)
- xv) Ala Thr Glu Ser His Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 17)
- xvi) Ala Thr Glu Ser His Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 18)
- xvii) Asp Leu Tyr His Ile Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Tyr Thr (SEQ-ID Nr. 19)
- xviii) Asp Leu Tyr His Ile Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Tyr Thr (SEQ-ID Nr. 20)
- xix) Glu Asn Pro Leu Pro Leu Phe Tyr Gly Pro Ser Val Leu Leu Xaa Glu Val Ser Pro Thr Pro Phe Asn Glu (SEQ-ID Nr. 21)

xx) Thr Glu Ser Ser Leu Ala Asn Leu (SEQ-ID Nr. 22)

- b) einer Sequenz, die für ein Protein mit einer Sequenz nach SEQ-ID Nr. 1 kodiert;
- c) einer Sequenz, die mit einer Sequenz nach b) hybridisiert oder unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hybridisieren würde;
- d) einem durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen erhaltenen Derivat einer Sequenz nach b) oder c); sowie
- e) einer komplementären Sequenz zu einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis d).

Das Merkmal "Sequenz, die mit einer Sequenz nach b) hybridisiert" weist auf eine Sequenz hin, die unter stringenten Bedingungen mit der Sequenz nach b) hybridisiert.

Beispielsweise können die Hybridisierungen bei 42°C mit einer Hybridisierungslösung bestehend aus 5 × SSPE, 5 × Denhardt's, 0.1% SDS, 100 µg/ml Lachssperma-DNA, 30–50% Formamid (Sambrook et al., 1989) durchgeführt werden. Als Waschbedingung eignet sich eine dreimal wiederholte 15minütige Waschung in 3 × SSC, 0.1% SDS bei 50°C.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Sequenz (1) die Sequenz nach SEQ-ID Nr. 2.

Zur Ausführung der Erfindung in Betracht kommende heterologe Promotoren sind z. B. der 35S-CaMV-Promotor vom Blumenkohlmosaik-Virus oder Promotoren von *Agrobacterium tumefaciens*, wie der Mannopin- oder der Nopalinsynthasepromotor. Insbesondere sind Promotoren von *Solanum tuberosum* verwendbar, beispielsweise der Licht-induzierbare Promotor des Gens für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase, der Promotor des Gens für das Chlorophyll abbindende Protein, der Promotor des ST-LS1-Gens, dessen Genprodukt am sauerstoff-erzeugenden Komplex des Photosystems II beteiligt ist; oder schwache konstitutive Promotoren, deren Aktivität nach Infektion mit *Phytophthora infestans* gesteigert wird, wie der Promotor des Stpk1-Gens (kodierend für eine Proteinkinase) oder der Promotor des ChtA2-Gens (codierend für eine saure Klasse II-Chitinase).

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung steht die Sequenz (1) unter der transkriptionellen Kontrolle einer Tetracyclin-regulierbaren Variante des 35S-CaMV-Promotors. Dieser Promotor beinhaltet drei Bindungsstellen für den TET-Repressor (Gatz et al., 1992): In Anwesenheit dieses Repressors werden diese Bindungsstellen durch das Repressorprotein besetzt, so daß die Promotoraktivität inhibiert wird. Das TET-Repressorprotein kann nun wiederum durch Tetracyclin inaktiviert werden, so daß der modifizierte Promotor seine Aktivität zurückgewinnt. Dieser modifizierte Promotor eignet sich somit hervorragend zum experimentellen Nachweis von Effekten der regulierten codierenden Region. Da in den transgenen Pflanzen gemäß der Erfindung kein TET-Repressor gebildet wird, arbeitet die Variante des 35S-CaMV-Promotors als starker konstitutiver Promotor.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält das chimäre Genkonstrukt zusätzlich Terminator- und/oder Polyadenylierungssequenzen, vorzugsweise den pAg7-Terminator. Andere verwendbare Terminator-Sequenzen sind z. B. der 35S-CaMV-Terminator, die 3' transkribierten, nicht-translatierten Regionen (Polyadenylierungssignal inklusive) der Nopalins- und Octopinsynthasegene von *Agrobacterium tumefaciens* oder Terminator-Sequenzen von Pflanzengenomen, beispielsweise die Terminator-Sequenz des Gens für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase.

Ferner betrifft die Erfindung eine Gewebekultur, die Zellen der transgenen Pflanzen wie oben beschrieben enthalten, sowie Sproßknollen der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen.

Ein weiteres technisches Problem bestand darin, Mittel zur Herstellung einer transgenen Pflanze mit erhöhter Resistenz gegen den Befall durch Phytopathogene, insbesondere durch den Oomyceten *Phytophthora infestans* bereitzustellen.

Dieses technische Problem wird erfindungsgemäß durch eine Nukleinsäure gelöst, die für ein Protein mit THT-Aktivität codiert und eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt wird aus:

a) einer Sequenz, die für ein Protein codiert, das mindestens eine der folgenden Aminosäuresequenzen enthält:

- i) Leu His Gly Glu Asn Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 3)
- ii) Leu His Gly Glu Thr Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 4)
- iii) Leu His Gly Arg Asn Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 5)
- iv) Leu His Gly Arg Thr Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 6)
- v) Ile Thr Thr Asn Glu Gly (SEQ-ID Nr. 7)
- vi) Phe Pro Val Val Glu Gly Gln Val Glu Glu Phe Arg Ser Lys (SEQ-ID Nr. 8)
- vii) Phe Pro Val Val Glu Gly Glu Val Glu Glu Phe Arg Ser (SEQ-ID Nr. 9)
- viii) Pro Val Leu Thr Thr Phe (SEQ-ID Nr. 10)
- ix) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 11)
- x) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 12)
- xi) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 13)
- xii) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 14)
- xiii) Ala Thr Glu Ser His Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 15)
- xiv) Ala Thr Glu Ser His Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 16)
- xv) Ala Thr Glu Ser His Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 17)
- xvi) Ala Thr Glu Ser His Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 18)
- xvii) Asp Leu Tyr His Ile Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Tyr Thr (SEQ-ID Nr. 19)
- xviii) Asp Leu Tyr His Ile Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Tyr Thr (SEQ-ID Nr. 20)
- xix) Glu Asn Pro Leu Pro Leu Phe Tyr Gly Pro Ser Val Leu Leu Xaa Glu Val Ser Pro Thr Pro Phe Asn Glu (SEQ-ID Nr. 21)
- xx) Thr Glu Ser Ser Leu Ala Asn Leu (SEQ-ID Nr. 22)

b) einer Sequenz, die für ein Protein mit einer Sequenz nach SEQ-ID Nr. 1 kodiert;

- c) einer Sequenz, die mit einer Sequenz nach b) hybridisiert oder unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hybridisieren würde;
- d) einem durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen erhaltenen Derivat einer Sequenz nach b) oder c); sowie
- e) einer komplementären Sequenz zu einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis d).

Ein Konstrukt, das eine erfindungsgemäße Nukleinsäure unter der Kontrolle von die Expression regulierenden Elementen enthält, wird von der Erfindung ebenfalls umfaßt. Vorzugsweise ist das Konstrukt ein binärer Vektor. Der erfindungsgemäße binäre Vektor kann Replikationssignale für *E. coli* und/oder *Agrobacterium* enthalten.

Soll das Konstrukt mittels *Agrobacterium* in eine Pflanzenzelle eingeführt und die erfindungsgemäße Nukleinsäure zusammen mit den die Expression regulierenden Elementen in das Genom integriert werden, so ist das Konstrukt ein Derivat des Ti- oder Ri-Plasmids, bei dem die zu integrierenden Sequenzen von T-DNA-Sequenzen flankiert werden, die die Integration ermöglichen. Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist bereits beschrieben worden (siehe z. B. Hoekema, 1985). Das Konstrukt kann ebenfalls einen Selektionsmarker enthalten, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum, wie z. B. Kanamycin, G418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin vermittelt und die Selektion transformierter Zellen gestattet.

Ein weiteres technisches Problem bestand in der Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung einer transgenen Pflanze, die erhöhte Resistenz gegen den Befall durch Phytopathogene, insbesondere gegen den Befall durch den Oomyceten *Phytophthora infestans* aufweist.

Dieses Problem wird gemäß der Erfindung durch ein Verfahren gelöst, das folgende Schritte umfaßt:

- a) Einbringen einer Nukleinsäure, umfassend:
 - i) einen heterologen Promotor, und
 - ii) eine Sequenz (1), die eine für ein Protein mit THT-Aktivität codierende Sequenz enthält und unter der transkriptionellen Kontrolle des heterologen Promotors steht, in eine Pflanzenzelle;
- b) Selektion der transformierten Zellen, und
- c) Regeneration einer transgenen Pflanze, die die eingebrachte codierende Sequenz exprimiert, aus den transformierten Zellen.

Ist die Nukleinsäure einmal im Genom der transgenen Pflanze integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Pflanzenzelle erhalten. Durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens können u. a. transgene Zuckerrüben-, Baumwoll-, Raps-, Melonen- oder Maispflanzen, und insbesondere Tabak-, Kartoffel- oder Tomatenpflanzen hergestellt werden.

Für das Einbringen der Nukleinsäure in eine Pflanzenzelle stehen neben der Transformation mit Hilfe von *Agrobakterien* noch zahlreiche weitere Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Fusion von Protoplasten, die Mikroinjektion von DNA und die Elektroporation sowie ballistische Methoden, Virusinfektion und die Verwendung von Liposomen. Anders als bei der Transformation mit Hilfe von *Agrobakterien*, werden bei der Injektion und Elektroporation an sich keine speziellen Anforderungen an den Vektor gestellt. Bei diesen Transformationsmethoden können also einfache Plasmide wie z. B. pUC-Derivate verwendet werden. Aus den transformierten Pflanzenzellen werden

dann in einem geeigneten Medium wieder ganze Pflanzen regeneriert. Die so erhaltenen Pflanzen können auf Anwesenheit der eingeführten Nukleinsäure getestet werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist in der im Schritt a) eingebrachten Nukleinsäure zusätzlich ein selektierbares Marker gen vorhanden, beispielsweise ein Gen, das der transformierten Pflanzenzelle Kanamycin-, Hygromycin-, Bialaphos-, Streptomycin- oder Methotrexat-Resistenz verleiht. Andere Marker gene, die in dem Verfahren gemäß der Erfindung eingesetzt werden können, sind das Beta-Glucuronidase-, das Luciferase- und das CAT(Chloramphenicol-Acetyltransferase)-Gen.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Nukleinsäure ein binärer Vektor, beispielsweise ein pBin19-Derivat, und wird mit Hilfe von *Agrobacterium* in die Pflanzenzelle eingebracht.

Die Erfindung umfaßt weiterhin die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur Erzeugung von Resistenz gegen den Befall durch Phytopathogene in Nutzpflanzen, insbesondere gegen den Befall durch den Oomyceten *Phytophthora infestans*. Ferner kann die Nukleinsäure gemäß der Erfindung oder ein Fragment davon zur Isolierung homologer Sequenzen aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen und/oder Tieren verwendet werden. Unter der Kontrolle eines regulatorischen Elements in Antisinnorientierung kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder ein Fragment davon zur Hemmung der Expression eines endogenen Proteins mit THT-Aktivität in pro- und/oder eukaryontischen Zellen verwendet werden. Vorzugsweise werden hierzu Fragmente von 20, besonders bevorzugt 50, ganz besonders bevorzugt 200 Nukleotide oder mehr verwendet. Eine weitere Verwendung der Nukleinsäure gemäß der Erfindung zielt auf die Expression eines Proteins mit THT-Aktivität in pro- und/oder eukaryontischen Zellen ab.

Die folgenden Figuren und Beispiele erläutern die Erfindung.

Fig. 1 zeigt die Auftrennung der aus der Spaltung eines THT-Proteins aus *Solanum tuberosum* mit der LysC-Endopeptidase erhaltenen Peptide mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC). Neben den Signalen werden die Sequenzen der identifizierten Peptide angegeben.

Fig. 2 zeigt die Nukleotidsequenz sowie die davon abgeleitete Proteinsequenz des EcoRI-Fragments aus dem pTHT3-Klon. Das Stop-Codon ist mit einem Stern gekennzeichnet. Peptidsequenzen mit einer hohen Homologie zu den in **Fig. 1** dargestellten Sequenzen sind unterstrichen und mit der jeweiligen Ziffer entsprechend der **Fig. 1** gekennzeichnet.

Fig. 3 ist eine schematische Darstellung der Konstruktion des binären Vektors pGTV-KAN, der die THT-cDNA enthält.

Ausführungsbeispiel

Partielle Bestimmung der Aminosäure-Sequenz eines Proteins mit Hydroxyzimtsäure-CoA : Tyramin-N-(Hydroxyzimtsäure)-Transferase (THT)-Aktivität und Synthese entsprechender DNA-Sondenmoleküle

Ein Protein mit Hydroxyzimtsäure-CoA : Tyramin-N-(Hydroxyzimtsäure)-Transferase (THT)-Aktivität wurde nach der von Hohlfeld et al. (1996) beschriebenen Methode aus einer Zellkultur von Kartoffelzellen (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) aufgereinigt. Die THT-Aktivität wurde wie von Hohlfeld et al. (1995) beschrieben bestimmt. Anschließend wurde das gereinigte Protein mit LysC-Endopeptidase enzymatisch gespalten und die resultierenden Peptid-Frag-

mente mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt. Wie aus **Fig. 1** ersichtlich, zeigten drei der Peptide eine gewisse Mikroheterogenität in ihrer primären Sequenz, die auf das Vorkommen von zwei verschiedenen, aber nah verwandten THT-Polypeptidketten hinweist.

Die Bestimmung der Peptid-Sequenzen wurde wie von Eckerskorn und Grimm (1996) beschrieben durchgeführt. Anhand der Sequenzen der Peptide 7 (XDLYHIYQLFYQIIIE/AYIINYT) und 3 bzw. 4 (TPVVEGQ/EVEEIIERS) wurden zwei Arten von Sondenmolekülen synthetisiert, die folgende DNA-Oligonucleotid-Sequenzen aufweisen:

5'-CAC/TATTTAC/TCAA/GC/TTTTTC/TTAC/TCAA/GATTC-3' (Peptid 7),

5'-CC/TTTCIACC/TTG/CICCC/TTCIACIACIGG-3' (Peptid 3 bzw. 4).

Mit diesen DNA-Oligonucleotid-Sequenzen als Primer wurde mittels RT-PCR cDNA synthetisiert. Hierfür wurde Superscript™ (Gibco, BRL) gemäß den Anweisungen des Herstellers eingesetzt. Als Matrize wurde Gesamt-RNA aus einer Kartoffelzellsuspensionskultur, die 5 Stunden lang einer Elicitierung mit Rohextrakten von *Phytophthora infestans* unterzogen war, verwendet. Bei Temperaturen von 42 bis 48°C erhielt man als PCR-Produkte DNA-Fragmente mit einer Länge von etwa 250 Basenpaaren, die in den Vektor pPCRII (Invitrogen) eingebaut und sequenziert wurden. Die Sequenzierung zeigte, daß die erhaltenen Fragmente DNA-Sequenzen enthalten, die für die Peptide 3 und 7 codieren.

Isolierung der cDNA-Klone

Aus einer Kartoffelzellsuspensionskultur (*Solanum tuberosum* cv. Désirée), die 5 Stunden lang einer Elicitierung mit *Phytophthora infestans* unterzogen worden war, wurde nach Dunsmuir et al. (1988) Gesamt-RNA isoliert. Aus der isolierten Gesamt-RNA wurde unter Verwendung von Dynabeads (Dynal, Hamburg) PolyA⁺-RNA aufgereinigt. Mit Hilfe eines Tíme Saver-Kits (Pharmacia, Freiburg) und mit PolyA⁺-RNA als Matrize wurde cDNA synthetisiert und anschließend in die EcoRI-Stelle vom Lambda-gt11 (Stratagene, Heidelberg) eingebaut. Nach der in vitro-Verpackung mit Hilfe von Gigapack® III Gold (Stratagene, Heidelberg) erhielt man eine Lambda-Bibliothek mit 7×10^6 pfu.

Als Probe für die Suche in der Lambda-gt11-Bibliothek wurde das nach PCR erhaltene 250-bp-Fragment, das vorab radioaktiv markiert worden war, verwendet. DNA aus positiven Plaques wurde isoliert und mit EcoRI enzymatisch gespalten. Die so erhaltenen Fragmente wurden anschließend in die EcoRI-Schnittstelle eines pUC18-Vektors eingebaut und mit Hilfe eines T7-Sequencing Kits (Pharmacia, Freiburg) oder eines automatischen LICOR-Sequenzierungsgerätes (MWG Biotech, Ebersberg) sequenziert. Einer der Klone enthielt ein Fragment mit einer Größe von etwa 1 kb, das als EcoRI-Fragment in pUC18 subkloniert wurde (Klon pTHT3). **Fig. 2** zeigt die Nukleotidsequenz der THT-cDNA dieses EcoRI-Fragments sowie die davon abgeleitete Proteinsequenz. Diese cDNA hat eine Länge von 938 bp und ein offenes Leseraster zwischen den Nukleotiden 53 und 796. Am 5'- und 3'-Ende sind nicht codierende, 52 bzw. 202 bp lange Sequenzen. Die 3'-Sequenz enthält jedoch keinen PolyA-Schwanz. Das von der ermittelten Sequenz codierte Protein besteht aus 248 Aminosäuren und hat ein errechnetes Molekulargewicht von 28,4 kDa. Spleiß-Stellen, die auf mögliche Introns hinweisen, sind nicht vorhanden.

Konstruktion des binären Vektors für die Pflanzentransformation

Aus dem binären Vektor pBIN-HYG-TX (Gatz, 1995) wurden der Tetracyclin-regulierbare 35S-CaMV-Promotor und der pAg7-Terminator isoliert und in den mit den Enzymen EcoRI und HindIII verdauten Vektor pGPTV-Kan (Becker et al., 1992) inseriert. In den resultierenden Vektor (pBKTx) wurde die TIT-cDNA unter die transkriptionelle Kontrolle der oben beschriebenen regulatorischen Elemente kloniert. Hierfür wurde der cDNA-Klon pTHT3 mit dem Restriktionsenzym Nco I verdaut und überhängende Enden wurden mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine Spaltung mit Xba I. Dieses cDNA-Fragment wurde in den oben beschriebenen Vektor pBKTx kloniert, der durch Inkubation mit den Restriktionsenzymen Sma I und Xba I geöffnet worden war. Alle rekombinanten DNA-Techniken wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Die resultierende T-DNA ist in **Fig. 3** schematisch dargestellt.

Der binäre Vektor wurde dann in einen Agrobacterium-Stamm eingeführt, mit dessen Hilfe Pflanzentransformationen durchgeführt werden können. Ein solcher Agrobacterium-Stamm enthält ein "entwaffnetes" Ti-Plasmid, d. h. ein Plasmid, dem die für die Bildung von Wurzelgallen erforderlichen Sequenzen fehlen, beispielsweise der Stamm LBA 4404 mit dem Plasmid pAL 4404 (Hoekema et al., 1983). Da keine T-DNA-border mehr vorhanden sind, kann aus diesem Plasmid keine DNA in das Pflanzen genom übertragen werden. Da die vir-Region noch vorhanden ist, können jedoch in trans Funktionen zur Verfügung gestellt werden, um den Transfer von T-DNAs anderer Plasmide zu ermöglichen, die T-DNA-border-Sequenzen besitzen. Dies trifft für den binären Vektor zu, dessen Konstruktion oben beschrieben wurde.

Der binäre Vektor kann in den Agrobacterium-Stamm mit Hilfe des "freeze-thaw"-Verfahrens (Höfgen und Willmitzer, 1988) eingeführt werden. Nach Erstellung eines Agrobacterium-Stammes mit dem oben beschriebenen binären Vektor wird dieser für die Pflanzentransformation verwendet.

Pflanzentransformation

Für die Transformation von Kartoffeln sind verschiedene Protokolle beschrieben worden (Ooms et al., 1987; De Block, 1988; Newell et al., 1991; Visser, 1991; Higgins et al., 1992; Yadav und Sticklen, 1995), die zur Herstellung der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen verwendet werden können.

So werden Agrobakterien (z. B. LBA 4404), die den binären Vektor tragen, bei 28°C in Gegenwart von Antibiotika, die u. a. eine Selektion auf den binären Vektor ermöglichen (Kanamycin), angezogen. Wenn die Bakteriensuspension eine OD₆₀₀ zwischen 0,7 und 0,9 erreicht hat, wird sie abzentrifugiert und in MS-Flüssigmedium resuspendiert.

Explantate von in vitro-Pflanzen zu transformierender Sorten werden geschnitten und in die Suspension gegeben. Es erfolgt eine Inkubation für ca. 30–60 min im Dunkeln. Danach werden die Internodien abgetropft und auf MS-Platten mit den Agrobakterien für 2 Tage co-kultiviert. Danach werden die Explantate auf sterilem Saugpapier abgetropft und auf MS-Agarplatten mit Phytohormonen und den Antibiotika Cefotaxim (500 mg/l) und Kanamycin (50 mg/l) übertragen. Die Konzentration und das Verhältnis von Auxin zu Cytokinin wird sortenspezifisch so eingestellt, daß es effizient zu Regenerationsereignissen kommt. Es erfolgt eine Inkubation bei 21°C und einem 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkel-Rhythmus für 2 Wochen.

Schließlich werden die Explantate überführt auf MS30-Agarplatten mit dem Cytokinin, statt dem Auxin nun GA3 und den oben beschriebenen Antibiotika. Alle zwei Wochen erfolgt nun ein Umsetzen auf das gleiche Medium, bis sich an den Kalli gut entwickelte Sprosse entwickelt haben. Die Sprossen werden dann auf Phytohormon-freies Medium umgesetzt. Nach der Bewurzelung werden die Pflanzen in Erde überführt.

Resistenztestung

Die resultierenden Pflanzen wurden auf ihr Resistenzverhalten gegen den phytopathogenen Oomyceten Phytophthora infestans überprüft. Für die Testung eignet sich der Hodgson-Test (Hodgson, 1961). Blätter werden entnommen und ausgestanzte Blattscheiben werden vorzugsweise mit Zoosporen eines komplexen Pathotypes des Oomyceten inokuliert. Die inokulierten Blattscheiben werden in Plastikboxen auf feuchtem Schaumstoff ausgelegt. Es erfolgt eine Inkubation bei 15°C und Dauerlicht. Die Bonitur erfolgt nach sieben Tagen gemäß einem Boniturschema gemäß Hodgson (1961). Aus der Anzahl der Boniturnoten wird dann die Befallshäufigkeit (Infektionserfolg) und der Sporulationsindex berechnet. Durch diesen Test ist das Ausmaß der reduzierten Suszeptibilität transgener Pflanzen im Vergleich zu den Ausgangssorten bestimmbar.

Literatur

- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. und Masterson, R. (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.* 20 1195–1197.
- De Block, M. (1988) Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor. Appl. Genet.* 76, 767–774.
- Dunsmuir, P., Bond, D., Lee, K., Gidoni, D., Townsend, J. (1988) Stability of introduced genes and stability in expression. *Plant Molecular Biology Manual* C I, 1–17.
- Eckerskon, E. und Grimm, K. (1996) Enhanced in situ gel digestion of electrophoretically separated proteins with automated peptide elution onto mini reversed-phase columns *Electrophoresis* 17, 899–906.
- Gatz, C. (1995) Novel inducible/repressible gene expression systems. *Methods in Cell Biology* Vol.50, Academic Press, 411–424.
- Gatz, C., Froberg, C., Wendenburg, R. (1992) Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact tobacco plants. *The Plant Journal* 2 397–404.
- Higgins, E. S., Hulme, J. S. und Shields, R. (1992) Early events in transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 82 109–118.
- Hodgson, W. A. (1961) Laboratory testing of the potato for partial resistance to *Phytophthora infestans*. *Am. Potato J.* 38, 259–264.
- Höfgen, R. und Willmitzer, L. (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* 16, 9877.
- Hoekema (1985) *The Binary Plant Vector System*, Kapitel V, Offset-drukkerij Kanters B. V. Ablasserdam.
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hoykaas, P. J. J., Schilperoort, R. A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179–180.
- Hohlfeld, H., Schürmann, W., Scheel, D. und Strack, D. (1995) Partial purification and characterization of hydroxycinnamoyl-coenzyme Aayramine hydroxycinnamoyltrans-

- ferase from cell suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiol.* 107, 545–552.
- Hohlfeld, H., Scheel, D. und Strack, D. (1996) Purification of hydroxycinnamoyltransferase from cell suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. cv *Datura*. *Planta* 199, 166–168. 5
- Newell, C.A., Rvzman, R., Hinchee, M.A., Lawson, B.C., Haley, L., Sanders, P., Kaniewski, W., Turner, N.E., Horsch, R.B. und Fraley, R.T. (1991) *Agrobacterium* mediated transformation of *Solanum tuberosum* L. cv. "Russet Burbank". *Plant Cell Reports* 10, 30–34. 10
- Oerke, E. E., Dehne, H. W., Schönbeck, F., Weber, A. (1994) *Crop Production and Crop Protection. Estimated Losses in Major Food and Cash Crops*. Elsevier, New York.
- Ooms, G., Burrell, M.M., Karp, A., Bevan, M. und Hille, J. (1987) Genetic transformation in two potato cultivars with T-DNA from disarmed *Agrobacterium*. *Theor. Appl. Genet.* 73, 744–750. 15
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 20
- Visser, R.G. (1991) Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Culture Manual B5*, 1–9, Kluwer Academic Publishers.
- Yadav, N. R. und Sticklen, M. B. (1995) Direct and efficient plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. cv. *Bintje*. *Plant Cell Reports* 14, 645–647. 25

Patentansprüche

1. Transgene Pflanze mit erhöhter Resistenz gegen den Befall durch Phytopathogene, insbesondere durch den Oomyceten *Phytophthora infestans*, deren Genom ein chimäres Genkonstrukt enthält, umfassend: 30
 - a) einen heterologen Promotor, und 35
 - b) eine Sequenz (1), die eine für ein Protein mit Hydroxyzimtsäure-CoA : Tyramin-N-(Hydroxyzimtsäure)-Transferase (THT)-Aktivität codierende Sequenz enthält und unter der transkriptionellen Kontrolle des heterologen Promotors steht. 40
2. Transgene Pflanze nach Anspruch 1, die der Familie Solanaceae angehört oder von dieser abgeleitet ist.
3. Transgene Pflanze nach Anspruch 2, die der Art *Solanum tuberosum* angehört oder von dieser abgeleitet ist. 45
4. Transgene Pflanze nach Anspruch 2, die der Art *Lycopersicon esculentum* angehört oder von dieser abgeleitet ist.
5. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz (1) von *Solanum tuberosum* stammt. 50
6. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz (1) ausgewählt wird aus: 55
 - a) einer Sequenz, die für ein Protein codiert, das mindestens eine der folgenden Aminosäuresequenzen enthält:
 - i) Leu His Gly Glu Asn Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 3)
 - ii) Leu His Gly Glu Thr Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 4) 60
 - iii) Leu His Gly Arg Asn Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 5)
 - iv) Leu His Gly Arg Thr Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 6) 65
 - v) Ile Thr Thr Asn Glu Gly (SEQ-ID Nr. 7)
 - vi) Phe Pro Val Val Glu Gly Gln Val Glu Glu Phe Arg Ser Lys (SEQ-ID Nr. 8)

- vii) Phe Pro Val Val Glu Gly Glu Val Glu Glu Phe Arg Ser (SEQ-ID Nr. 9)
- viii) Pro Val Leu Thr Thr Phe (SEQ-ID Nr. 10)
- ix) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 11)
- x) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 12)
- xi) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 13)
- xii) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 14)
- xiii) Ala Thr Glu Ser His Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 15)
- xiv) Ala Thr Glu Ser His Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 16)
- xv) Ala Thr Glu Ser His Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 17)
- xvi) Ala Thr Glu Ser His Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 18)
- xvii) Asp Leu Tyr His Ile Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Tyr Thr (SEQ-ID Nr. 19)
- xviii) Asp Leu Tyr His Ile Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Tyr Thr (SEQ-ID Nr. 20)
- xix) Glu Asn Pro Leu Pro Leu Phe Tyr Gly Pro Ser Val Leu Leu Xaa Glu Val Ser Pro Thr Pro Phe Asn Glu (SEQ-ID Nr. 21)
- xx) Thr Glu Ser Ser Leu Ala Asn Leu (SEQ-ID Nr. 22)
- b) einer Sequenz, die für ein Protein mit einer Sequenz nach SEQ-ID Nr. 1 kodiert;
- c) einer Sequenz, die mit einer Sequenz nach b) hybridisiert oder unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hybridisieren würde;
- d) einem durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen erhaltenen Derivat einer Sequenz nach b) oder c); sowie
- e) einer komplementären Sequenz zu einer Sequenz nach einer der Gruppen a) bis d).
7. Transgene Pflanze nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz (1) die Sequenz nach SEQ-ID Nr. 2 ist.
8. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der heterologe Promotor eine Tetracyclin-regulierbare Variante des 35S-CaMV-Promotors ist.
9. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das chimäre Genkonstrukt zusätzlich Terminator- und/oder Polyadenylierungssequenzen enthält.
10. Transgene Pflanze nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Terminator-Sequenz der pAg7-Terminator ist.
11. Gewebekultur, enthaltend Zeilen oder Organe einer transgenen Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

12. Sproßknollen einer transgenen Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

13. Nukleinsäure, die für ein Protein mit THT-Aktivität codiert und eine Sequenz umfaßt, die ausgewählt wird aus:

a) einer Sequenz, die für ein Protein codiert, das mindestens eine der folgenden Aminosäuresequenzen enthält:

i) Leu His Gly Glu Asn Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 3)

ii) Leu His Gly Glu Thr Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 4)

iii) Leu His Gly Arg Asn Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 5)

iv) Leu His Gly Arg Thr Leu Gln Lys (SEQ-ID Nr. 6)

v) Ile Thr Thr Asn Glu Gly (SEQ-ID Nr. 7)

vi) Phe Pro Val Val Glu Gly Gln Val Glu Glu Phe Arg Ser Lys (SEQ-ID Nr. 8)

vii) Phe Pro Val Val Glu Gly Glu Val Glu Glu Phe Arg Ser (SEQ-ID Nr. 9) viii) Pro Val Leu Thr Thr Phe (SEQ-ID Nr. 10)

ix) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 11)

x) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 12)

xi) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 13)

xii) Ala Thr Glu Ser Ser Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 14)

xiii) Ala Thr Glu Ser His Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 15)

xiv) Ala Thr Glu Ser His Leu Ala Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 16)

xv) Ala Thr Glu Ser His Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 17)

xvi) Ala Thr Glu Ser His Leu Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Asn Thr (SEQ-ID Nr. 18)

xvii) Asp Leu Tyr His Ile Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Glu Tyr His Asn Tyr Thr (SEQ-ID Nr. 19)

xviii) Asp Leu Tyr His Ile Tyr Gln Leu Phe Tyr Gln Ile His Ala Tyr His Asn Tyr Thr (SEQ-ID Nr. 20)

xix) Glu Asn Pro Leu Pro Leu Phe Tyr Gly Pro Ser Val Leu Leu Xaa Glu Val Ser Pro Thr Pro Phe Asn Glu (SEQ-ID Nr. 21)

xx) Thr Glu Ser Ser Leu Ala Asn Leu (SEQ-ID Nr. 22)

b) einer Sequenz, die für ein Protein mit einer Sequenz nach SEQ-ID Nr. 1 kodiert;

c) einer Sequenz, die mit einer Sequenz nach b) hybridisiert oder unter Berücksichtigung der Degeneration des genetischen Codes hybridisieren würde;

d) einem durch Substitution, Addition, Inversion und/oder Deletion einer oder mehrerer Basen erhaltenen Derivat einer Sequenz nach b) oder c); sowie

e) einer komplementären Sequenz zu einer Se-

quenz nach einer der Gruppen a) bis d).

14. Konstrukt, das eine Nukleinsäure nach Anspruch 13 unter der Kontrolle von die Expression regulierenden Elementen enthält.

15. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 10, das folgende Schritte umfaßt:

a) Einbringen einer Nukleinsäure, umfassend:

i) einen heterologen Promotor, und

ii) eine Sequenz (1), die eine für ein Protein mit THT-Aktivität codierende Sequenz enthält und unter der transkriptionellen Kontrolle des heterologen Promotors steht,

in eine Pflanzenzelle;

b) Selektion der transformierten Zellen, und

c) Regeneration einer transgenen Pflanze, die die eingebrachte codierende Sequenz exprimiert, aus den transformierten Zellen.

16. Verfahren nach Anspruch 15, bei dem in der eingebrachten Nukleinsäure zusätzlich ein selektierbares Markergen vorhanden ist.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure ein binärer Vektor ist und mit Hilfe von *Agrobacterium* in die Pflanzenzelle eingebracht wird.

18. Verwendung einer Nukleinsäure nach Anspruch 13 zur Erzeugung von Resistenz gegen den Befall durch Phytopathogene in Nutzpflanzen, insbesondere gegen den Befall durch den Oomyceten *Phytophthora infestans*.

19. Verwendung einer Nukleinsäure nach Anspruch 13 zur Expression eines Proteins mit THT-Aktivität in pro- und/oder eukaryontischen Zellen.

20. Verwendung einer Nukleinsäure nach Anspruch 13 oder ein Fragment davon zur Isolierung homologer Sequenzen aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen und/oder Tieren.

21. Verwendung einer Nukleinsäure nach Anspruch 13 oder ein Fragment davon unter der Kontrolle eines regulatorischen Elements in Antisinnorientierung zur Hemmung der Expression eines endogenen Proteins mit THT-Aktivität in pro- und/oder eukaryontischen Zellen.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig. 1

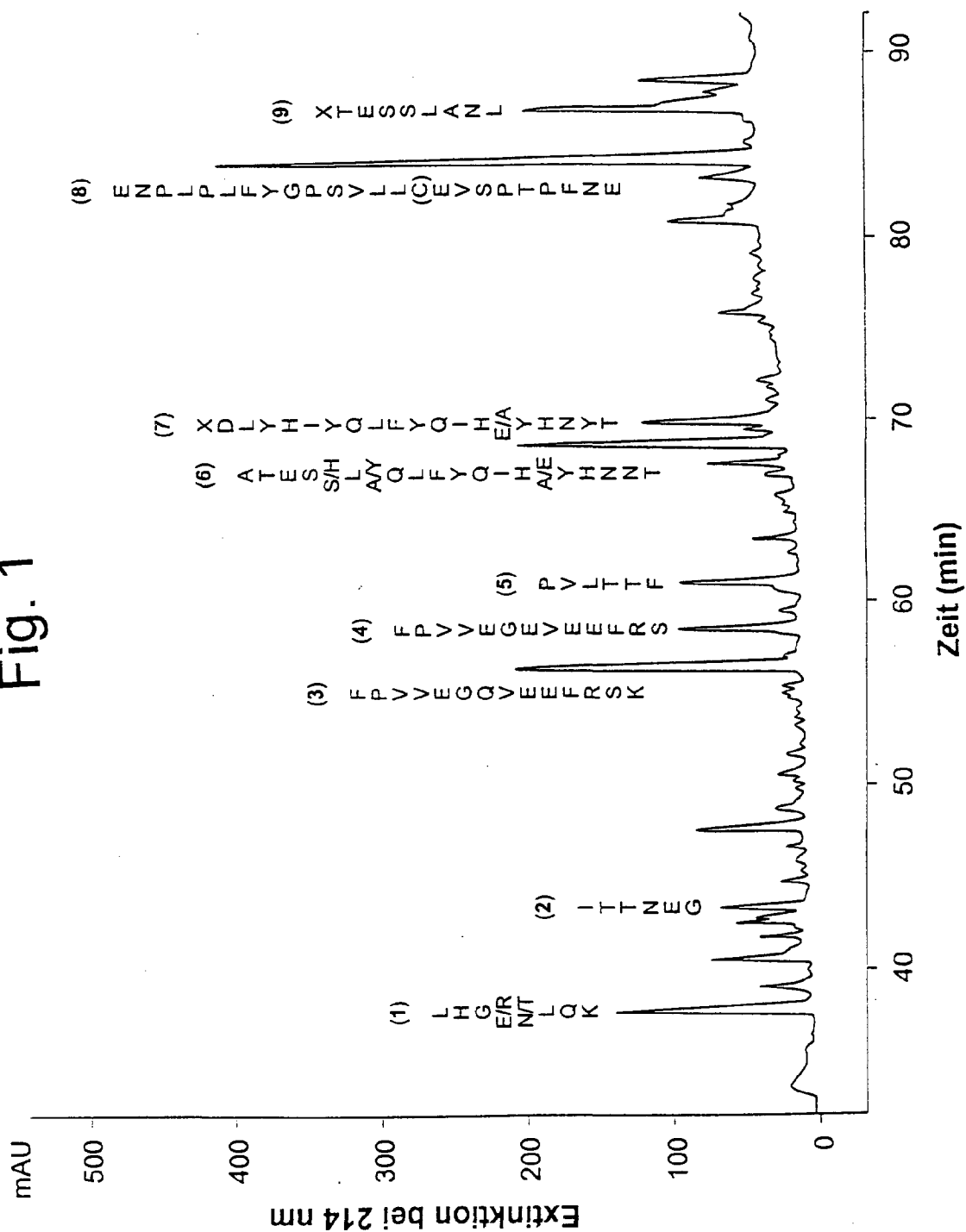


Fig. 2

1	TCTTTTATCTTAAACCTCAATATTCTCTCAAACCTTAACTAAACAATATCCCATGGCTCC	60
	M A P	3
61	TGCTCCTCAACTTCCTACACCATCTGAAACAATAACCACCGATGCATCATCGGAAAAACA	120
4	A P Q L P T P S E T I T T D A S S E N N	23
121	CAATGTTACCATCACTGAAAAGATATACACACGAGTCCGTCTGGCTACGAAATCTGATCT	180
24	N V T I T E K I Y T R V R L A T K S <u>D L</u>	43
PCR	-----G--T--G-----G--G-----	
131	GTCTCATATATACCAATTGTTTATCAAATCCATGAATACCATAACTATACTCATTTATA	240
44	<u>S H I Y Q L F Y Q I H E Y H N Y T H L Y</u>	63
	⑦	
PCR	-----AAGG-----T-----T-----A-----	
241	CAAAGCTACTGAGTCCTCCTTAGCCAACCTGCTCTTTAAAGAAAACCTCTTCCCCTTTT	300
64	K A <u>T E S S L A N L L F K E N P L P L F</u>	83
	⑨	
PCR	-----T-----	
301	CTACGGGCCATCCGTACTTCTACTTGAAGTCTCTCCAACCCCTTTTAACGAACCCAAAA	360
84	<u>Y G P S V L L L E V S P T P F N E P K N</u>	103
	⑧	
PCR	-----G-----G-----C--C--	
361	TACCACAAACGAAGGGTTCAAGCCTGTCCTTACAACCTTTTGACCTTAAATTCCCTGTGGT	420
104	<u>T T N E G F K P V L T T F D L K F P V V</u>	123
	② ⑥	
PCR	C--G--C-----C--A-	
421	GGAAGGACAAGTTGAGGAGTTCAGGTCCAAATATGACGATAAGAATGATGCTTACATTGC	480
124	<u>E G Q V E E F R S K Y D D K N D A Y I A</u>	143
	③ ④	
491	AGGATATGCTTTCTTTTACGCTAATTATTCATGTTTCTATGACAAGCCAGGATTCTATTT	540
144	G Y A F F Y A N Y S C F Y D K P G F Y F	163
541	TGAGAGTCTTTTACTTCAGAGAGAGTTATAGAAAGTTGGGAATGGGGAGTTTGTGTTGG	600
164	E S L Y F R E S Y R K L G M G S L L F G	183
601	AACAGTTGCATCTATTGCTGCAAACAATGGCTTCGTATCGGTAGAGGGAATAGTAGCAGT	660
184	T V A S I A A N N G F V S V E G I V A V	203
661	TTGGAATAAAAAGTCATATGATTTTTTACATAAATATGGGAGTTGAAATTTTTGATGAGTT	720
204	W N K K S Y D F Y I N M G V E I F D E F	223
721	TAGGTATGGCAAGTTGCATGGTGAAAATCTTCAAAGTATGCTGATAAAAAGGACGAAAA	780
224	R Y G K <u>L H G E N L Q K Y A D K K D E N</u>	243
	①	
781	CGGCGAAGGGAGCTGTTAGTAGAGAATGGCTTTTTGTGTGCCTAATTGTGCAATTTATTA	840
244	G E G S C *	248
841	ATTTCTATTTGTGATTATATTGTAAAACCAGAATGCTCATTATATTTGTAATTTGAAAAAT	900
901	AAAATAAAATTGGTAATTGTGATATTATATTAAATCCA	938

Fig. 3

